



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 111989562 A

(43) 申请公布日 2020.11.24

(21) 申请号 201980025958.7

(22) 申请日 2019.05.23

(30) 优先权数据

62/680,554 2018.06.04 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2020.10.15

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2019/054296 2019.05.23

(87) PCT国际申请的公布数据

W02019/234544 EN 2019.12.12

(71) 申请人 DH科技发展私人贸易有限公司

地址 新加坡新加坡

(72) 发明人 A·格特曼 M·斯扎尔卡

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所
有限公司 11038

代理人 马景辉

(51) Int.Cl.

G01N 21/64 (2006.01)

H01J 49/16 (2006.01)

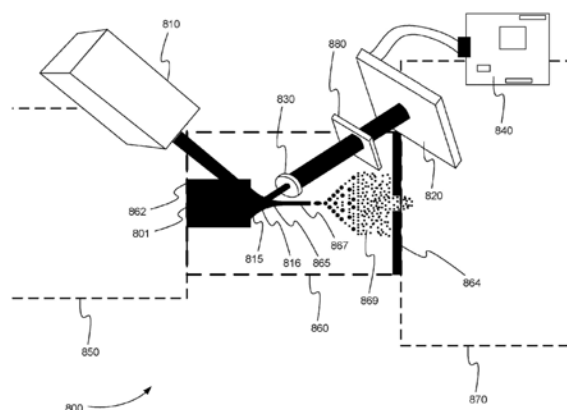
权利要求书2页 说明书12页 附图10页

(54) 发明名称

用于ESI-MS中泰勒锥处的荧光团标记的分析物的LBMFI检测器

(57) 摘要

在质谱仪的离子源设备中对样品的荧光标记的分子进行定量。照明源设备用于照射样品的至少第一部分。当样品在离子源设备中被离子化时，样品被照射以激发样品的荧光标记的分子。二维数字图像检测器在多个时间间隔中的每个时间间隔测量样品的被照射的第一部分的至少第二部分的图像。在多个时间间隔中的每个时间间隔的每个测得的图像被存储在存储器设备中。根据存储的测得的图像计算第二部分的随时间变化的强度的迹线。根据计算出的第二部分的随时间变化的强度的迹线计算荧光标记的分子的数量。



1. 一种用于对质谱仪的离子源设备中的样品的荧光标记的分子进行定量的系统,包括:

照明源设备,所述照明源设备在样品在离子源设备中被离子化时并且在所述样品进入质谱仪之前照射所述样品的至少第一部分以激发所述样品的荧光标记的分子;

二维数字图像检测器;

一个或多个透镜,所述一个或多个透镜被定位在所述第一部分和所述二维数字图像检测器之间,其中所述一个或多个透镜将所述第一部分的至少第二部分聚焦在所述二维数字图像检测器上,并且所述二维数字检测器在多个时间间隔中的每个时间间隔测量所述第二部分的图像;以及

一个或多个处理器,所述一个或多个处理器将在所述多个时间间隔中的每个时间间隔的每个测得的图像存储在存储器设备中,根据存储的测得的图像计算所述第二部分的随时间变化的强度,以及根据计算出的所述第二部分的随时间变化的强度计算所述荧光标记的分子的量。

2. 如权利要求1所述的系统,还包括带通滤波器,所述带通滤波器被定位在所述第二部分和所述二维数字图像检测器之间,其中所述带通滤波器将聚焦在所述二维数字图像检测器上的光过滤成具有特定频率范围。

3. 如权利要求1所述的系统,其中所述照明源设备包括激光器。

4. 如权利要求1所述的系统,其中所述样品通过注射设备被引入到所述离子源设备中。

5. 如权利要求1所述的系统,其中所述样品通过分离设备被引入到所述离子源设备中。

6. 如权利要求5所述的系统,其中所述分离设备包括毛细管电泳CE设备。

7. 如权利要求5所述的系统,其中所述分离设备包括液相色谱LC设备。

8. 如权利要求5所述的系统,其中所述一个或多个处理器包括所述分离设备的处理器。

9. 如权利要求1所述的系统,其中所述离子源设备包括电喷雾离子化ESI离子源设备。

10. 如权利要求1所述的系统,其中所述第二部分包括所述样品的泰勒锥的区域。

11. 如权利要求1所述的系统,其中所述一个或多个处理器包括所述质谱仪的处理器。

12. 如权利要求1所述的系统,其中所述一个或多个处理器接收根据由所述质谱仪对所述荧光标记的分子进行的测量计算出的提取离子色谱XIC,并将所述XIC与计算出的所述第二部分的随时间变化的强度进行比较。

13. 如权利要求1所述的系统,其中所述离子源设备包括基质辅助的激光解吸离子化MALDI离子源设备。

14. 一种用于对质谱仪的离子源设备中的样品的荧光标记的分子进行定量的方法,包括:

使用一个或多个处理器指示照明源设备在样品在离子源设备中被离子化时并且在所述样品进入质谱仪之前照射所述样品的至少第一部分以激发所述样品的荧光标记的分子;

使用所述一个或多个处理器指示二维数字图像检测器在多个时间间隔中的每个时间间隔测量所述第一部分的至少第二部分的图像,其中一个或多个透镜被定位在所述第一部分和所述二维数字图像检测器之间,以将所述第二部分聚焦在所述二维数字图像检测器上;

使用所述一个或多个处理器将在所述多个时间间隔中的每个时间间隔的每个测得的

图像存储在存储器设备中；

使用所述一个或多个处理器根据存储的测得的图像计算所述第二部分的随时间变化的强度；以及

使用所述一个或多个处理器根据计算出的所述第二部分的随时间变化的强度计算所述荧光标记的分子的量。

15. 一种计算机程序产品,所述计算机程序产品包括非暂态的有形的计算机可读存储介质,所述计算机可读存储介质的内容包括具有在处理器上被执行以便执行用于对质谱仪的离子源设备中的样品的荧光标记的分子进行定量的方法的指令的程序,所述方法包括:

提供系统,其中所述系统包括一个或多个不同软件模块,并且其中所述不同软件模块包括测量模块和分析模块;

使用所述测量模块指示照明源设备在样品在离子源设备中被离子化时并且在所述样品进入质谱仪之前照射所述样品的至少第一部分以激发所述样品的荧光标记的分子;

使用所述测量模块指示二维数字图像检测器在多个时间间隔中的每个时间间隔测量所述第一部分的至少第二部分的图像,其中一个或多个透镜被定位在所述第一部分和所述二维数字图像检测器之间,以将所述第二部分聚焦在所述二维数字图像检测器上;

使用所述测量模块将在所述多个时间间隔中的每个时间间隔的每个测得的图像存储在存储器设备中;

使用所述分析模块根据存储的测得的图像计算所述第二部分的随时间变化的强度;以及

使用所述分析模块根据计算出的所述第二部分的随时间变化的强度计算所述荧光标记的分子的量。

用于ESI-MS中泰勒锥处的荧光团标记的分析物的LBMFI检测器

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求于2018年6月4日提交的美国临时专利申请序列No. 62/680,554的权益,其内容通过引用整体并入本文。

技术领域

[0003] 本文的教导涉及用于对质谱仪的离子源设备中的样品的荧光标记的分子进行定量的系统和方法。更具体而言,本文的教导涉及用于使用激光束介导的荧光团成像(LBMFI)刚好在质量分析之前对质谱仪的离子源中的样品化合物的荧光标记的分子进行定量的系统和方法。本文的系统和方法可以结合处理器、控制器或计算机系统(诸如图1的计算机系统)来执行。

背景技术

[0004] CE-LIF-MS

[0005] 例如,毛细管电泳(CE)与激光诱导荧光(LIF)检测结合是灵敏的高性能的生物分析技术。分离基于在窄孔毛细管中由电场梯度驱动的带电分析物分子的差分电迁移。将CE与质谱法(MS)耦合为样品组分的结构鉴定给出了附加的分离维度和信息。但是,由于在电喷雾中的离子化过程期间不稳定化合物的源内降解的可能性,因此强烈建议同时使用光学检测系统,诸如荧光。换句话说,在MS之前具有LIF检测的CE是建议的,以便检测由于离子源中的碎裂而引起的样品组分的损失或降解。

[0006] 在过去的二十年中,MS开始广泛被用在组学领域、临床和监管实验室中以及被制药行业使用。触发这种占优的主要贡献之一是电喷雾离子化(ESI)的发明,电喷雾离子化使可检测的分析物质量范围增长到远远超过100kDa。而且,所需的样品浓度范围达到低至皮摩尔水平。因此,将CE与电喷雾离子化互连(CE-ESI-MS)是有前途的用于双分子分析的新技术,尤其是在单个动态过程中具有CE-ESI-MS(CESI)接口。已经进行了一些尝试将CE-MS与荧光或吸光度检测器耦合。但是,这种在线检测尝试的主要缺点之一是检测探针区与MS检测器之间的毛细管距离长,从而导致生成的两条迹线的分辨率不同且难以追踪。一些作者报告了该领域中的进展。但是,由于复杂的仪器技能要求,该技术的应用似乎仍然受到限制。

[0007] 复合糖结构(也称为聚糖)附着于细胞表面受体蛋白质或细胞外蛋白质(诸如抗体)并具有多种特定生物学功能。治疗性抗体的充足且安全的生产要求对这些新型药物的高度详细检查的质量控制,包括对其糖基化的全面分析。糖基化分析最常用的生物分析工具之一是CE。由于碳水化合物在大多数情况下不带电且没有UV吸收或荧光特性,因此它们经由转移氢化被带电的荧光团标记。虽然荧光团标记的碳水化合物的光学检测提供了样品组分的定量分布数据,但是MS中的光学检测取决于离子化过程(包括离子化效率)并且甚至可以由于源内降解而造成结构改变。这些由源内降解引起的结构改变可以包括重要糖结构

的核心岩藻糖基化或触角唾液酸化的损失,从而导致错误的结果,如早前在Wang等人, *Journal of Separation Science*, 36, (2013), 2862-2867 (下文中为“Wang论文”)中报道的那样。因此,与MS过程同时进行光学检测非常重要。

[0008] 遗憾的是,目前尚无用于例如刚好紧接在使荧光分析物分子(诸如氨基芘三磺酸盐(aminopyrenetrisulfonate)标记的糖、荧光素标记的蛋白质、肽或代谢物、荧光团嵌入剂标记的核酸)进入质谱仪的孔口中之前同时检测它们的可用方法。据报道,在CE中,到目前为止最接近的荧光检测是距孔口12cm,并且检测是通过毛细管材料,即玻璃。除了由于在检测点处存在玻璃毛细管材料而引起的检测灵敏度的损失之外,这还造成了光学和MS检测信号之间的迁移时间偏移。

[0009] 除了用于定量的MS的特定于溶质的离子化效率之外,另一个普遍的问题是一些分析物分子可能损失某些不稳定残基,例如,据报道,复合的碳水化合物损失核心岩藻糖或末端唾液酸单元。因此,在没有同时进行光学检测的情况下,所得到的MS谱可能无法表示在研究的化合物的结构。

[0010] 因此,需要刚好在荧光分析物分子进入质谱仪之前检测这些分子的改进的系统和方法。以这种方式,光学检测信号精确地与MS检测信号对应,因此揭示任何离子化介导的效率和结构改变(例如岩藻糖基化或唾液酸化的损失)。

发明内容

[0011] 公开了用于对质谱仪的离子源设备中的样品的荧光标记的分子进行定量的系统、方法和计算机程序产品。所有三种实施例包括以下步骤。

[0012] 照明源设备照射样品的至少第一部分以激发样品的荧光标记的分子。当样品在离子源设备中被离子化时并且在样品进入质谱仪之前,照明源设备照射第一部分。

[0013] 一个或多个透镜被定位在样品的第一部分和二维数字图像检测器之间。一个或多个透镜将样品的第一部分的至少第二部分聚焦在二维数字图像检测器上。

[0014] 二维数字检测器在多个时间间隔中的每个时间间隔测量第二部分的图像。一个或多个处理器将在多个时间间隔中的每个时间间隔的每个测得的图像存储在存储器设备中。一个或多个处理器根据存储的测得的图像计算样品的第二部分的随时间变化的强度。一个或多个处理器根据计算出的第二部分的随时间变化的强度计算荧光标记的分子中的一种或多种的量。

[0015] 本文阐述申请人的教导的这些和其它特征。

附图说明

[0016] 本领域技术人员将理解的是,以下描述的附图仅用于说明目的。附图无意以任何方式限制本教导的范围。

[0017] 图1是图示在其上可以实现本教导的实施例的计算机系统的框图。

[0018] 图2是示例性毛细管电泳(CE)系统200。

[0019] 图3是来自Szarka等人, *Anal. Chem* 2017, 89, 10673-10678 (下文中为“Szarka论文”)的图,该图示出了在CE系统中使用智能电话电荷耦合设备(CCD)检测器来检测欠载样品。

[0020] 图4是根据各种实施例的使用OptiMS毛细管盒和6500+QTRAP MS仪器的CESI 8000单元的毛细管电泳和电喷雾离子化与激光束介导的荧光团成像和质谱法 (CESI-LBMFI-MS) 接口耦合的侧视图照片和图。

[0021] 图5是示出根据各种实施例的氨基苊三磺酸盐APTS标记的麦芽糖样品的LBMFI的图像。

[0022] 图6是根据各种实施例的用于分析APTS标记的麦芽低聚糖的LBMFI和MS迹线的图线的对准。

[0023] 图7是根据各种实施例的用于分析PNGaseF消化的且APTS标记的免疫球蛋白G N-聚糖的LBMFI和MS迹线的图线的对准。

[0024] 图8是根据各种实施例的用于对质谱仪的离子源设备中的样品的荧光标记的分子进行定量的系统的示意图。

[0025] 图9是示出根据各种实施例的用于对质谱仪的离子源设备中的样品的荧光标记的分子进行定量的方法的流程图。

[0026] 图10是根据各种实施例的包括一个或多个不同软件模块的系统的示意图,该一个或多个不同软件模块执行用于对质谱仪的离子源设备中的样品的荧光标记的分子进行定量的方法。

[0027] 在详细描述本教导的一个或多个实施例之前,本领域的技术人员将认识到的是,本教导的应用不限于在以下详细描述中阐述的或在附图中图示的构造的细节、部件的布置和步骤的布置。而且,应该理解的是,本文所使用的措词和术语是出于描述的目的,而不应当被认为是限制性的。

具体实施方式

[0028] 计算机实现的系统

[0029] 图1是图示可以在其上实现本教导的实施例的计算机系统100的框图。计算机系统100包括总线102或用于传送信息的其它通信机构,以及与总线102耦合用于处理信息的处理器104。计算机系统100还包括存储器设备106,存储器设备106可以是随机存取存储器设备(RAM)或其它动态存储设备,存储器设备106耦合到总线102,用于存储要由处理器104执行的指令。存储器设备106还可以用于在要由处理器104执行的指令的执行期间存储临时变量或其它中间信息。计算机系统100还包括耦合到总线102的只读存储器设备(ROM) 108或其它静态存储设备,用于存储用于处理器104的静态信息和指令。诸如磁盘或光盘之类的存储设备110被提供并且耦合到总线102,用于存储信息和指令。

[0030] 计算机系统100可以经由总线102耦合到显示器112(诸如阴极射线管(CRT)或液晶显示器(LCD)),用于向计算机用户显示信息。包括字母数字键和其它键的输入设备114耦合到总线102,用于将信息和命令选择传送到处理器104。另一种类型的用户输入设备是光标控件116,诸如鼠标、轨迹球或光标方向键,用于将方向信息和命令选择传送到处理器104并用于控制显示器112上的光标移动。这种输入设备通常具有两个轴(即,第一轴(即,x)和第二轴(即,y))上的两个自由度,这允许设备指定平面中的位置。

[0031] 计算机系统100可以执行本教导。与本教导的某些实施方式一致,响应于处理器104执行存储器设备106中包含的一个或多个指令的一个或多个序列而由计算机系统100提

供结果。这样的指令可以从诸如存储设备110之类的另一个计算机可读介质读入存储器设备106。存储器设备106中包含的指令的序列的执行使处理器104执行本文所述的处理。可替代地,可以使用硬连线电路代替软件指令或与软件指令结合来实现本教导。因此,本教导的实施方式不限于硬件电路和软件的任何特定组合。

[0032] 在各种实施例中,计算机系统100可以跨网络连接到一个或多个其它计算机系统(像计算机系统100一样),以形成联网系统。网络可以包括私有网络或诸如互联网之类的公共网络。在联网系统中,一个或多个计算机系统可以存储数据并将数据供应给其它计算机系统。在云计算场景中,可以将存储和供应数据的一个或多个计算机系统称为服务器或云。例如,一个或多个计算机系统可以包括一个或多个web服务器。例如,向服务器或云发送数据和从服务器或云接收数据的其它计算机系统可以被称为客户端或云设备。

[0033] 如本文所使用的,术语“计算机可读介质”是指参与向处理器104提供指令以供执行的任何介质。这样的介质可以采取许多形式,包括但不限于非易失性介质、易失性介质和传输介质。非易失性介质包括例如光盘或磁盘,诸如存储设备110。易失性介质包括动态存储器设备,诸如存储器设备106。传输介质包括同轴线缆、铜线和光纤,包括包含总线102的电线。

[0034] 计算机可读介质或计算机程序产品的常见形式包括例如软盘、柔性盘、硬盘、磁带或任何其它磁性介质、CD-ROM、数字视频盘(DVD)、蓝光盘、任何其它光学介质、拇指驱动器、存储器设备卡、RAM、PROM和EPROM、FLASH-EPROM、任何其它存储器设备芯片或盒、或计算机可以从中读取的任何其它有形介质。

[0035] 各种形式的计算机可读介质可以涉及将一个或多个指令的一个或多个序列携带给处理器104以供执行。例如,指令最初可以被携带在远程计算机的磁盘上。远程计算机可以将指令加载到其动态存储器设备中,并使用调制解调器通过电话线发送指令。计算机系统100本地的调制解调器可以在电话线上接收数据,并使用红外发送器将数据转换成红外信号。耦合到总线102的红外检测器可以接收红外信号中携带的数据,并将数据放置在总线102上。总线102将数据携带给存储器设备106,处理器104从存储器设备106检索并执行指令。由存储器设备106接收的指令可以可选地在被处理器104执行之前或之后存储在存储设备110上。

[0036] 根据各种实施例,被配置为由处理器执行以执行方法的指令被存储在计算机可读介质上。计算机可读介质可以是存储数字信息的设备。例如,计算机可读介质包括如本领域中已知的用于存储软件的致密盘只读存储器设备(CD-ROM)。计算机可读介质由适于执行被配置为被执行的指令的处理器访问。

[0037] 为了说明和描述的目的,已经给出了本教导的各种实施方式的以下描述。它不是穷尽的并且不将本教导限制到所公开的精确形式。鉴于以上教导,修改和变化是可能的,或者可以从本教导的实践中获得。此外,所描述的实施方式包括软件,但是本教导可以被实现为硬件和软件的组合或者单独地以硬件来实现。本教导可以用面向对象和非面向对象的编程系统二者来实现。

[0038] MS和MS/MS背景

[0039] 一般而言,质谱法(或MS)是用于分析化合物的众所周知的技术。MS涉及将来自样品的一种或多种化合物离子化、产生一种或多种化合物的前驱物离子以及对前驱物离子中

的一种或多种进行质量分析。

[0040] 串联质谱法(或MS/MS)涉及将来自样品的一种或多种化合物离子化、选择一种或多种化合物的一种或多种前驱物离子、使一种或多种前驱物离子碎裂成碎片或产物离子以及对产物离子进行质量分析。

[0041] MS和MS/MS可以提供定性和半定量信息二者。前驱物或产物离子谱可以被用于识别感兴趣的分子。一种或多种前驱物或产物离子的强度可以被用于对样品中存在的化合物的量进行定量。

[0042] 分离耦合的MS和MS/MS背景

[0043] 质谱法(MS)(或质谱法/质谱法(MS/MS))和分离技术(诸如CE或液相色谱法(LC))的组合是用于识别和定量混合物中的化合物的重要分析工具。一般而言,在液相色谱法中,例如,使所分析的流体样品通过填充有固体吸收性材料(通常采用小固体颗粒(例如,二氧化硅)的形式)的柱。由于混合物的组分与固体吸收性材料(通常被称为固定相)的相互作用略有不同,因此不同组分穿过填充柱的通过(洗脱)时间可以不同,从而导致各种组分的分离。在LC-MS中,可以使离开LC柱的流出物连续地经历质谱分析,以生成提取离子色谱(XIC)或LC峰,XIC或LC峰可以描绘检测到的离子强度(检测到的离子的数量的度量、一种或多种特定分析物的总离子强度)随洗脱或保留时间的变化。

[0044] 在一些情况下,LC流出物可以经历串联质谱法(或质谱法/质谱法MS/MS),以用于识别与XIC中的峰对应的产物离子。例如,可以基于前驱物离子的质量/电荷比来选择要经历后续质量分析阶段的前驱物离子。然后将所选择的前驱物离子碎裂(例如,经由碰撞诱导解离),并且可以经由后续质谱法阶段分析碎裂的离子(产物离子)。

[0045] 电泳系统和方法

[0046] 电泳方法被用于促进目标分析物的检测。这样的方法利用溶液中的分子具有固有电荷的事实。因此,在存在电场的情况下,每种分子物种都以特征“电泳”迁移率迁移,该特征“电泳”迁移率取决于分子物种的流体力学体积与电荷的比例。当这个比例在存在的各种物种之间不同时,它们彼此分离。在这种场的影响下,所有变体都将朝着与变体的电荷相反的指定电荷移动;具有较低电泳迁移率的那些将比具有(相对)较高电泳迁移率的那些移动得慢,并因此与之分离。

[0047] 电泳已经被用于混合物的分离和分析。电泳涉及基于迁移率差异的分子在电场中的迁移和分离。已知多种形式的电泳,包括自由区带电泳、凝胶电泳、等电聚焦和等速电泳。一般而言,CE涉及将样品引入毛细管(即内直径为从大约2 μm 至大约2000 μm (优选地,小于大约50 μm ;最优选地,大约25 μm 或更小)的管),并将电场施加到管(Chen, F-T.A., J.Chromatogr. 516:69*78(1991); Chen, F-T.A.等人, J.Chromatogr. 15:1143*1161(1992))。由于每种样品成分都有其自己的个体的电泳迁移率,因此具有较大迁移率的那些比具有较慢迁移率的那些更快地行进通过毛细管。因此,样品的成分在其通过管的迁移期间被解析到毛细管中的离散的区中。该方法非常适合自动化,因为它提供了方便的在线注射、检测和实时数据分析。

[0048] 图2是示例性CE系统200。CE系统200包括CE设备210和检测器220。CE设备210包括具有光学查看窗212的熔融石英毛细管211、可控制的高压电源213、两个电极组件214和两个缓冲液储存器215。当检测器220是光学检测器时,毛细管211的端部被放置在缓冲液储存

器中,并且光学查看窗212与检测器220对准。在用缓冲液填充毛细管211之后,可以将样品注射到毛细管211中。

[0049] 电泳基本上是带电粒子在施加的电场内的移动。在CE中,在毛细管211的一端注射样品。在毛细管211的远离样品的另一端将检测器220定位或附接到毛细管211。沿着毛细管211的长度施加由高压电源213和两个电极组件214提供的电压。

[0050] 在施加电位的情况下,发生两个分开的流动效应。这些流动效应中的第一个是总样品流动效应。样品大量移动到毛细管中。这些流动效应中的第二个是电泳流动。这使得样品的具有不同电荷的成分相对于毛细管211内的主流体流移动。因此,在毛细管211中分离样品的具有不同电荷与流体力学比例的部分。

[0051] 在已发生电泳分离之后,可以使用不同的检测器来分析样品。这些检测器可以包括但不限于紫外(UV)检测器、激光诱导荧光(LIF)检测器或质谱仪。例如,使用UV检测器来测量由分离的样品吸收的UV光的量。例如,LIF检测器被用于提供标记的分子物种的高灵敏度测量。

[0052] 在将毛细管电泳与电喷雾离子化(ESI)和质谱法(MS)组合的系统中,毛细管的输出被输入到电喷雾组件。电喷雾离子化是通过在分离毛细管的出口处相对于质谱仪的毛细管入口放置高电压电位来实现的。分离毛细管还要求在其入口和出口之间放置高电压电位。样品的被分离的部分在离开毛细管时被电喷雾分散成细小的气溶胶。然后通过质谱法观察气溶胶的微滴。

[0053] 与早期开发的仪器相比,全自动CE设备为所有操作提供计算机控制,压力和电动注射、自动采样器和馏分收集器、自动方法开发、精确的温度控制和先进的散热系统。自动化对CE至关重要,因为精确的定量分析要求可重复的操作。

[0054] 具有CCD成像的CE

[0055] 在通过引用并入本文的Szarka论文中,描述了具有电荷耦合设备CCD成像的CE。Szarka论文涉及应用数字成像技术来解决CE中样品欠载或过载所带来的问题。

[0056] 常规液相色谱法(LC)和CE系统通常使用二极管阵列检测器(DAD)、光电倍增管(PMT)或雪崩光电二极管(APD)来检测荧光标记的分子。但是,与数字CCD不同,DAD不能够存储原始图像以进行后处理。因此,如果在LC或CE实验中应用了不正确的设置或选择了不正确的样品浓度(欠载或过载),那么必须重新运行实验。重复LC或CE实验是昂贵且费时的。此外,对珍贵的样品进行重复实验甚至可能是不可能的。

[0057] 为了防止由于样品欠载或过载而引起的重复实验,Szarka论文描述了修改CE系统以使用便宜的智能电话CCD检测器。使用CCD检测器允许存储欠载或过载的样品的原始图像。然后,使用信号处理算法对这些原始图像进行分析,以量化欠载或过载的样品,而无需重复任何实验。

[0058] 蓝色LED(未示出)被用于照射毛细管310的部分315。此外,在毛细管310的照明侧使用激发滤波器(未示出)和二向色镜(未示出)。激发滤波器和二向色镜仅允许绿光照射毛细管310的部分315。

[0059] 在毛细管310的检测器侧,由毛细管310中的荧光标记的分子发射的光被物镜320收集并聚焦在CCD 330上。随时间对来自CCD 330的原始图像进行采样并将其发送到微控制器340。微控制器340是Raspberry Pi-3微型计算机。微控制器340存储原始图像,并用于对

这些存储的图像进行后处理。

[0060] 例如,图3示出了微控制器340如何使用后处理来改善欠载或低浓度样品的结果。图线331描绘了亮度相对于时间的未经处理的迹线332。换句话说,迹线332描绘了随时间从CCD 330的原始数据确定的亮度。因为样品浓度低,所以迹线332仅示出一个峰。

[0061] 相反,图线341描绘了亮度相对于时间的经处理的迹线342。迹线342是微控制器340将正直方图值位移(PHVD)算法应用于存储的原始数据的结果。与迹线332相比,尽管样品浓度低,迹线342仍示出了附加的主峰。由于原始数据的后处理,无需重新运行实验。

[0062] 用于检测离子源中的荧光分析物分子的系统和方法

[0063] 遗憾的是,如上所述,目前尚无用于例如刚好紧接在使荧光分析物分子(诸如氨基苊三磺酸盐标记的糖、荧光素标记的蛋白质、肽或代谢物、荧光团嵌入剂标记的核酸)进入质谱仪的孔口之前同时检测它们的可用方法。而且,一些分析物分子可能损失某些不稳定的残基,例如,据报道,复合的碳水化合物损失核心岩藻糖或末端唾液酸单元。因此,在没有同时进行光学检测的情况下,所得到的MS谱可能无法表示在研究的化合物的结构。因此,需要用于刚好在荧光分析物分子进入质谱仪之前检测这些分子的改进的系统和方法。

[0064] 在各种实施例中,检测系统刚好在离子源中的离子化的点处检测荧光分析物分子。例如,在电喷雾离子化(ESI)中,刚好在电喷雾本身的泰勒锥处检测荧光分析物分子,就紧接在这些分子进入质谱仪之前。以这种方式,光学检测信号精确地与MS检测信号对应,从而揭示任何离子化介导的效率和结构改变(诸如例如岩藻糖基化或唾液酸化的损失)。

[0065] 此外,由于检测是在喷雾本身中显现的,因此检测路径中不涉及来自分离设备的材料。来自分离设备的材料可以包括但不限于来自液相色谱设备的柱材料或来自毛细管电泳设备的毛细管材料。以这种方式,容易支持荧光分子的定量剖析。

[0066] 在一个优选实施例中,与激光、LED或任何其它光束介导的荧光团成像和电喷雾离子化质谱法一起使用毛细管电泳(CE-LBMFI-ESI-MS)来刚好在离子源中离子化的点处检测荧光分析物分子。例如,这种系统可以被用于分析pM浓度范围内的线性和复合的碳水化合物。

[0067] 例如,CESI 8000(SCIEX,Brea,CA)毛细管电泳单元被用于分离,其中OptiMS毛细管盒和ESI接口连接到6500+Qtrap(SCIEX)质谱仪。对于基于图像获取的检测,使用“侦查望远镜”单筒望远镜设置。

[0068] 图4是根据各种实施例的使用OptiMS毛细管盒和6500+QTRAP MS仪器的CESI8000单元的CESI-LBMFI-MS接口耦合的侧视图400照片和图。泰勒锥处的激发是经由用405nm激光器(未示出)进行的照明来实现的。发射的光经由物镜410被传输到智能成像系统。在CESI-LBMFI-MS分析期间,通过泰勒锥喷射的荧光标记的分子通过区段420的带通滤波器421、目镜422和CCD 423被成像。

[0069] 单筒望远镜的物镜410距目标约3cm远,该目标是被蚀刻的分离毛细管的喷嘴尖端的端部(在泰勒锥处,如下面所示的图5中所描绘的)。405nm二极管激光器的3b类被以3.0V驱动。它从尖端以85°的方位角和60°的天顶角照射喷雾区。单筒望远镜通过12.5mm直径的E0520/10(EDMUNDS OPTICS INC.,NJ,美国)发射滤波器421收集来自喷雾区的发射光。被收集并经过带通滤波的光通过附接的目镜422到达Pi NoIR SONY IMX219 8百万像素CCD相机423(SONY SEMICONDUCTOR SOLUTIONS CO.Kanagawa,日本)。考虑到被分析的氨基苊三磺酸

盐 (APTS)-糖缀合物的宽Stokes偏移,使用仅一个光学滤波器421提供足够的信号。

[0070] 图5是示出根据各种实施例的APTS标记的麦芽糖样品的激光束介导的荧光成像 (LBMFI) 的图像500。图5示出了被照射的泰勒锥510,其是在毛细管的尖端处的锥,从中发出离子化的粒子的射流。发黑区段520覆盖分离毛细管的端部。发黑区段530覆盖质谱仪的孔口。

[0071] 例如,如在Szarka论文中那样,成像微控制器是信用卡尺寸的ARM cortex Raspberry Pi-3微型计算机,其用作运行Raspbian (Raspberry Pi) 操作系统的预处理器单元。从客户端机器通过SSH协议给它命令。从SSH终端Putty (Simon Tatham, Cambridge, 英国) 通过使用Raspistill库 (Raspberry Pi) 以延时模式执行图像处理。例如,图像以jpeg文件格式产生。

[0072] 例如,触发信号和图像处理由控制CESI 8000单元的客户端机器执行。电泳图显示和分析脚本用Matlab (MathWorks Inc., Natick, 美国) 和ImageJ/Fiji (Wayne Rasband, NIH, Bethesda, 美国) 宏语言编写。附加的MIJ库 (Biomedical Imaging Group, Lausanne, 瑞士) 用于Fiji和Matlab软件之间的互操作。

[0073] 例如,快速聚糖样品制备和分析试剂盒 (SCIEX) 方案被用于制备APTS标记的麦芽低聚糖和IgG样品。

[0074] CE是出色的液相分离工具,它能够分辨即使具有完全相同质量的荧光团标记的复合糖分子的键合和位置异构体。ESI (电喷雾离子化) 通过在喷嘴尖端处向样品施加高电压而将液体样品转化为离子化的气溶胶形式 (气相)。经由SCIEX的CESI接口进行的电喷雾过程将CE和ESI的两种分析方法耦合为单个动态过程。而且,在电喷雾离子化期间,除了固有的溶质依赖性离子化速率外,还可能会发生分析物源内碎裂,这可能会使结构识别不明确。这个的良好示例是如上所述在APTS标记的复合聚糖的质谱分析期间核心岩藻糖基化和唾液酸化的损失。

[0075] 在各种实施例中,离子源处的荧光允许精确确定最优离子化能,以使在CE和MS侧二者的峰强度的质量和数量相等。如图4所描绘的,所提出的设置利用分离毛细管的端部处的喷雾作为目标,以将带通滤波器、目镜和CCD聚焦在光路中。检测组件经由分开的3D台上的夹具放置在可调节台架上的纳喷雾源上方。其相对于MS孔口仔细定位。

[0076] 在分析之前,分离毛细管分别用0.1M的NaOH和0.1M的HCl冲洗10分钟,并且最后用MQ水冲洗。在漂洗过程之后,将系统定位在适当的位置,并且分离毛细管以及导电毛细管线用适当的背景电解质填充。首先,通过施加3psi达4秒钟将水塞注射到分离毛细管中,然后在20秒钟内通过10kV将样品电动注射。通过在30°C施加30kV,该分离花费40分钟 (记录的分流:20分钟),并且通过荧光和MS检测均得到APTS标记的麦芽低聚糖梯的高分辨率的峰。

[0077] 图6是根据各种实施例的用于分析APTS标记的麦芽低聚糖的LBMFI和MS迹线的图线的对准600。在图线610中,迹线611示出了由上述LBMFI系统的CCD进行的亮度相对于时间 (电泳图) 的测量。在图线620中,迹线621示出了同一样品的由质谱仪分析进行的强度相对于时间的测量 (提取离子色谱)。对准600示出迹线611和迹线621均产生相同的主麦芽低聚糖梯峰。这意味着离子源的LBMFI系统能够准确地对荧光分析物分子进行定量。

[0078] 在泰勒锥中的荧光检测与MS孔口之间的短距离 (<5mm) 导致电泳图的实际上实时的图像获取以及糖分子的质量信息。

[0079] 再次,产生迹线611和迹线612的实验的条件包括:7.5mM乙酸铵背景电解质(pH 4.75);90cm有效长度,30 μ m ID的裸露熔融石英OptiMS毛细管,带有有孔喷雾器;注射:水塞3psi达4s,10kV达20s样品;施加的电压和压力:在分离期间30kV(注射侧处的阴极)和3psi的向前压力;温度:30 $^{\circ}$ C。

[0080] 在另一个实验中,通过图4的CESI-LBMFI-ESI-MS系统分析了PNGaseF消化的且APTS标记的免疫球蛋白G N-聚糖。在这个实验中也使用上述相同的条件。

[0081] 图7是根据各种实施例的用于分析PNGaseF消化的且APTS标记的免疫球蛋白G N-聚糖的LBMFI和MS迹线的图线的对准700。在图线710中,迹线711示出了由上述LBMFI系统的CCD进行的亮度相对于时间(电泳图)的测量。在图线720中,迹线721示出了同一样品的由质谱仪分析进行的强度相对于时间的测量(提取离子色谱)。对准700示出了由在MS迹线721中出现但在LBMFI 711中不出现的离子化电压诱导的聚糖结构改变造成的碎裂模式。具体而言,离子化能高于用于峰量化的最优范围。因此,在14-15分钟之间下部MS迹线721中的峰没有出现在光学检测迹线711中,并且因此不表示荧光团标记的物种,从而强调这里提出的双重检测系统的重要性。

[0082] 用于对离子源中的荧光标记的分子进行定量的系统

[0083] 图8是根据各种实施例的用于对质谱仪的离子源设备中的样品的荧光标记的分子进行定量的系统的示意图800。图8的系统包括照明源设备810、二维数字图像检测器820、一个或多个透镜830以及一个或多个处理器840。

[0084] 照明源设备810照射样品801的至少第一部分815以激发样品801的荧光标记的分子。当样品801在离子源设备860中被离子化时并且在样品进入质谱仪870之前,照明源设备810照射第一部分815。样品801的荧光标记的分子例如是样品801的感兴趣的化合物或分析物。

[0085] 照明源设备810可以是能够激发样品801的荧光标记的分子的任何类型的照明源设备,包括但不限于发光二极管(LED)设备或激光器。在各种实施例中,照明源设备810优选地是激光器,以便允许照明源设备810被定位在距样品801一定距离处。

[0086] 二维数字图像检测器820可以是任何类型的二维数字图像检测器,包括但不限于电荷耦合设备(CCD)、互补金属氧化物半导体(CMOS)设备或数字相机。在各种实施例中,二维数字图像检测器820 810优选地是智能电话中使用的便宜的CCD类型。

[0087] 一个或多个透镜830被定位在样品801的第一部分815与二维数字图像检测器820之间。例如,在图8中,物镜830被示出为被定位在样品801的第一部分815附近。在各种实施例中,如上所述,一个或多个透镜830可以包括在二维数字图像检测器820附近的目镜(未示出)。

[0088] 一个或多个透镜830将第一部分815的至少第二部分816聚焦在二维数字图像检测器820上。要注意的是,第二部分816可以是第一部分815的全部或一部分。

[0089] 二维数字检测器820在多个时间间隔中的每个时间间隔测量第二部分816的图像。换句话说,二维数字检测器820随时间对样品801的第二部分816成像。

[0090] 如上所述并且在各种实施例中,照明源设备810以第一频率或波长对样品801的第一部分815成像。然后,二维数字图像检测器820测量由于Stokes偏移引起的第二频率或波长。Stokes偏移是由于荧光标记的分子对光的吸收与发射的差异而引起的频率或波长的差

异。

[0091] 一个或多个处理器840可以包括计算机、微控制器、微处理器、图1的计算机系统或者能够发送和接收控制信号和数据以及处理数据的任何设备中的一个或多个。一个或多个处理器840与照明源设备810、二维数字检测器820通信并且彼此通信。

[0092] 一个或多个处理器840将在多个时间间隔中的每个时间间隔的每个测得的图像存储在存储器设备(未示出)中。存储器设备可以是一个或多个处理器840中的一个或多个的存储器设备、分开的存储器设备、或者跨通信通道可用的远程存储器设备(诸如云存储器设备)。

[0093] 如上所述,在一个实施例中,使用两个处理器。微控制器(诸如ARM cortex Raspberry Pi-3成像微控制器)被用于预处理。然后,控制CESI 8000单元的客户机器被用于控制或触发信号以及图像处理。在各种替代实施例中,可以使用单个处理器。

[0094] 一个或多个处理器840根据存储的测得的图像计算第二部分816的随时间变化的强度。在各种实施例中,一个或多个处理器840可以通过计算接收一定范围的颜色二维数字检测器820的面积来计算每个图像的强度。如Szarka论文中所述,二维数字检测器820的每个像素可以进行24位测量。这种测量由红色、蓝色和绿色三种颜色或通道组成。三种颜色中的每一种都可以具有从0到255的8位值。每个像素还表示二维数字检测器820的面积。

[0095] 例如,如果一个或多个处理器840认为在10到150之间的每个绿色通道中的测量表示来自样品801的荧光标记的分子的信号,那么认为做出在这个范围内的测量的每个像素已测量到荧光标记的分子。

[0096] 为了确定整个图像的强度,将每个像素的面积乘以被认为已测量到荧光标记的分子的像素的数量。因此,每个图像的强度实际上是每个图像的面积。然后,每个测得的存储的图像的面积被用于计算第二部分816的随时间变化的强度。

[0097] 一个或多个处理器840根据计算出的第二部分816的随时间变化的强度计算荧光标记的分子的量。计算出的第二部分816的随时间变化的强度是迹线,诸如图6的迹线611或图7的迹线711。这些迹线包括峰。

[0098] 本领域普通技术人员理解如何根据测得的迹线的峰确定已知样品的量。例如,在各种实施例中,一个或多个处理器840可以通过计算这些迹线的峰的面积并且例如将它们与从预期的已知化合物的校准样品测得的峰进行比较来计算荧光标记的分子的量。

[0099] 在各种实施例中,图8的系统还包括定位在第二部分816与二维数字图像检测器820之间的带通滤波器880。带通滤波器880将聚焦在二维数字图像检测器880上的光过滤成在特定频率或波长范围内。

[0100] 在各种实施例中,样品801通过注射或分离设备850被引入离子源860。分离设备可以包括但不限于毛细管电泳(CE)设备、液相色谱(LC)设备或迁移率设备。

[0101] 在各种实施例中,一个或多个处理器840可以包括注射或分离设备850的处理器或质谱仪870的处理器。

[0102] 在图8中,照射源设备810、二维数字图像检测器820、一个或多个透镜830、一个或多个处理器840和带通滤波器880被示出为在离子源设备860的外部。在各种实施例中,照明源设备810、二维数字图像检测器820、一个或多个透镜830、一个或多个处理器840以及带通滤波器880是离子源设备860的一部分或被集成到离子源设备860中。此外,离子源设备860

可以是注射或分离设备850或者质谱仪870的一部分或被集成到注射或分离设备850或者质谱仪870中。

[0103] 离子源设备860可以是任何类型的离子源设备,包括但不限于电喷雾离子化 (ESI) 离子源设备、基质辅助的激光解吸离子化 (MALDI) 离子源设备、电子离子化 (EI) 离子源设备、化学离子化 (CI) 离子源设备或电感耦合等离子体离子化 (ICP) 离子源设备。

[0104] 在各种实施例中,并且如图8中所示,离子源设备860优选地是ESI离子源设备。ESI离子源设备包括毛细管862和还原金属板864。样品801从ESI离子源设备毛细管862发出,作为泰勒锥865、射流867和羽流(plume)869。

[0105] 在优选实施例中,样品801的第二部分816是泰勒锥865的区域。由于第二部分816包括第一部分815的一部分或全部,因此样品801的第一部分815还必须包括泰勒锥865的区域。对泰勒锥865成像是优选的,因为更有可能在射流867或羽流869中发生碎裂。但是,在各种替代实施例中,可以对射流867或羽流869进行照明和成像。

[0106] 在各种实施例中,一个或多个处理器840接收根据由质谱仪870对荧光标记的分子进行的测量计算出的提取离子色谱(XIC),并将该XIC与计算出的第二部分816的随时间变化的强度进行比较。

[0107] 质谱仪870可以是但不限于飞行时间(TOF)、四极、离子阱、线性离子阱、轨道阱或傅立叶变换质谱仪。

[0108] 用于对离子源中的荧光标记的分子进行定量的方法

[0109] 图9是示出根据各种实施例的用于对质谱仪的离子源设备中的样品的荧光标记的分子进行定量的方法900的流程图。

[0110] 在方法900的步骤910中,使用一个或多个处理器指示照明源设备照射样品的至少第一部分。当样品在离子源设备中被离子化时并且在样品进入质谱仪之前,照射样品以激发样品的荧光标记的分子。

[0111] 在步骤920中,使用一个或多个处理器指示二维数字图像检测器在多个时间间隔中的每个时间间隔测量第一部分的至少第二部分的图像。一个或多个透镜被定位在第一部分和二维数字图像检测器之间,以将第二部分聚焦在二维数字图像检测器上。

[0112] 在步骤930中,使用一个或多个处理器将在多个时间间隔中的每个时间间隔的每个测得的图像存储在存储器设备中。

[0113] 在步骤940中,使用一个或多个处理器根据存储的测得的图像计算第二部分的随时间变化的强度。

[0114] 最后,在步骤950中,使用一个或多个处理器根据计算出的第二部分的随时间变化的强度计算荧光标记的分子的量。

[0115] 用于识别聚糖的计算机程序产品

[0116] 在各种实施例中,计算机程序产品包括有形的计算机可读存储介质,该计算机可读存储介质的内容包括具有在处理器上被执行以便执行用于对质谱仪的离子源设备中的样品的荧光标记的分子进行定量的方法的指令的程序。这种方法由包括一个或多个不同软件模块的系统执行。

[0117] 图10是根据各种实施例的包括一个或多个不同软件模块的系统的示意图1000,该一个或多个不同软件模块执行用于对质谱仪的离子源设备中的样品的荧光标记的分子进

行定量的方法。系统1000包括测量模块1010和分析模块1020。

[0118] 测量模块1010指示照明源设备照射样品的至少第一部分。当样品在离子源设备中被离子化时并且在样品进入质谱仪之前,照射样品以激发样品的荧光标记的分子。

[0119] 测量模块1010指示二维数字图像检测器在多个时间间隔中的每个时间间隔测量第一部分的至少第二部分的图像。一个或多个透镜被定位在第一部分和二维数字图像检测器之间,以将第二部分聚焦在二维数字图像检测器上。测量模块1010将在多个时间间隔中的每个时间间隔的每个测得的图像存储在存储器设备中。

[0120] 分析模块1020根据存储的测得的图像计算第二部分的随时间变化的强度。最后,分析模块1020根据计算出的第二部分的随时间变化的强度计算荧光标记的分子的数量。

[0121] 虽然结合各种实施例描述了本教导,但是并不旨在将本教导限于这样的实施例。相反,如本领域技术人员将认识到的,本教导包含各种替代方案、修改和等同形式。

[0122] 另外,在描述各种实施例时,说明书可以已经呈现了作为步骤的特定序列的方法和/或处理。但是,就方法或处理不依赖于本文阐述的步骤的特定次序而言,方法或处理不应当限于所描述的步骤的特定序列。如本领域普通技术人员将认识到的,步骤的其它序列可以是可能的。因此,说明书中阐述的步骤的特定次序不应当被解释为对权利要求的限制。此外,针对方法和/或处理的权利要求不应当限于以所写次序执行其步骤,并且本领域技术人员可以容易地认识到,这些序列可以变化并且仍保持在各种实施例的精神和范围之内。

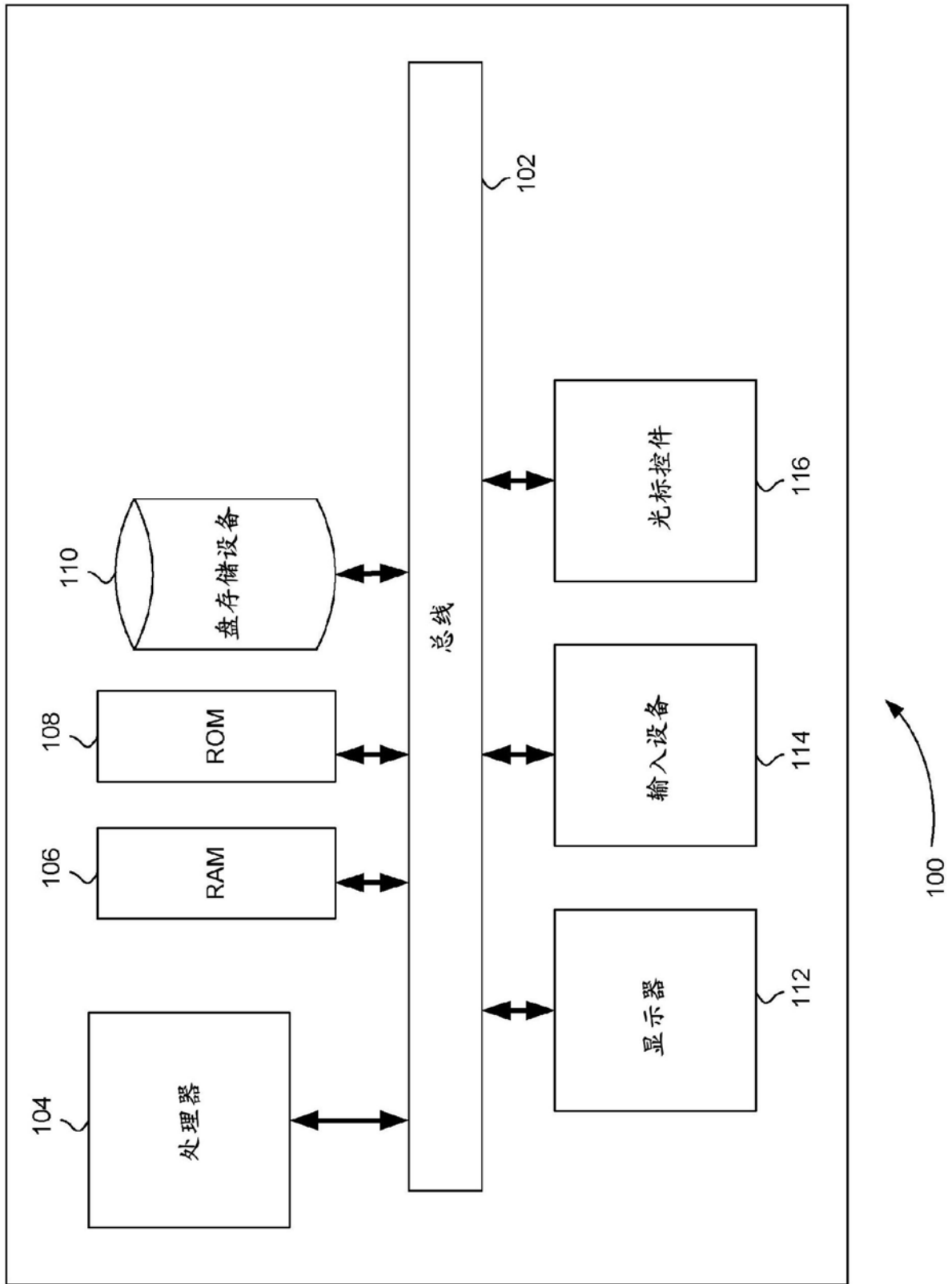


图1

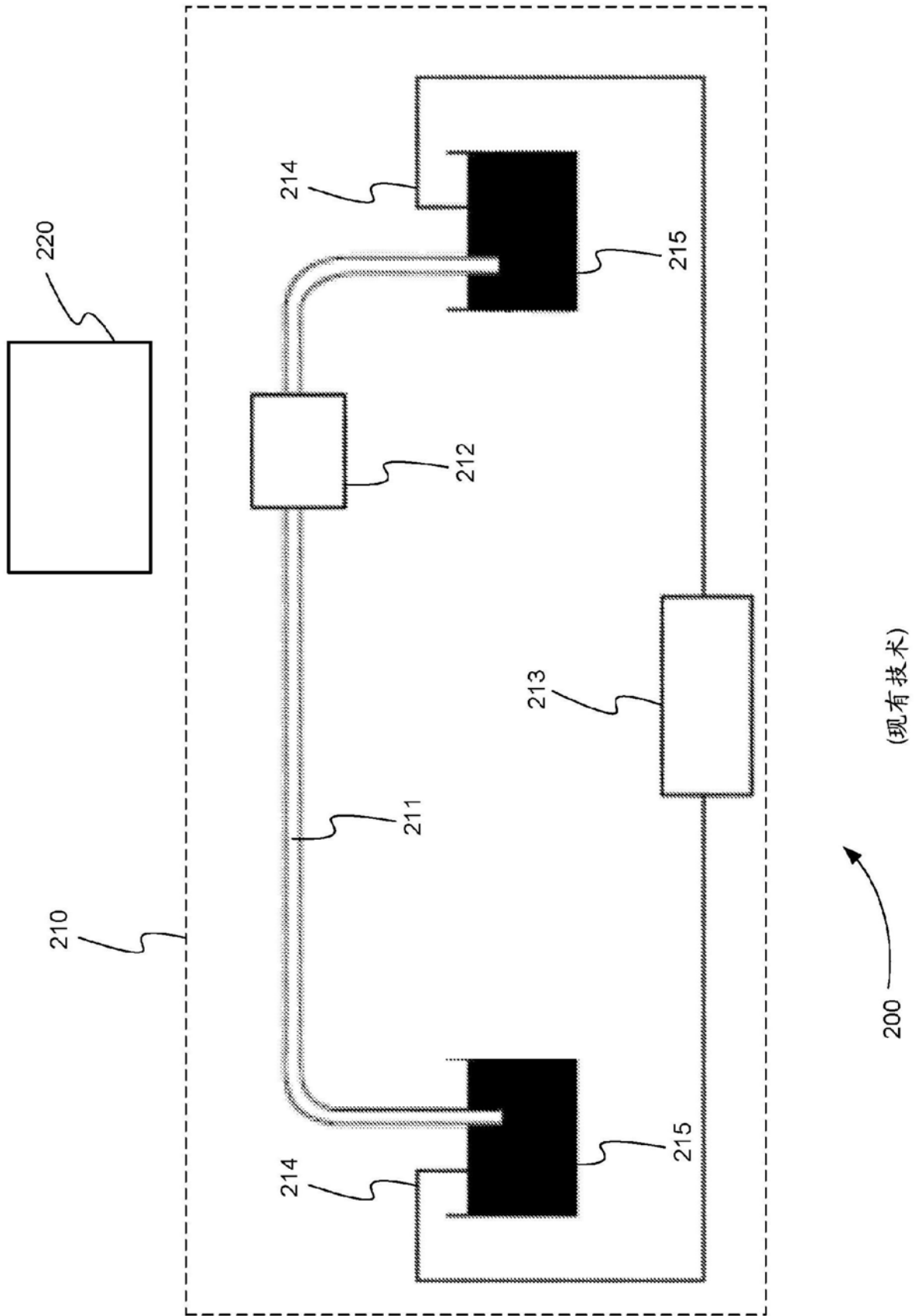


图2

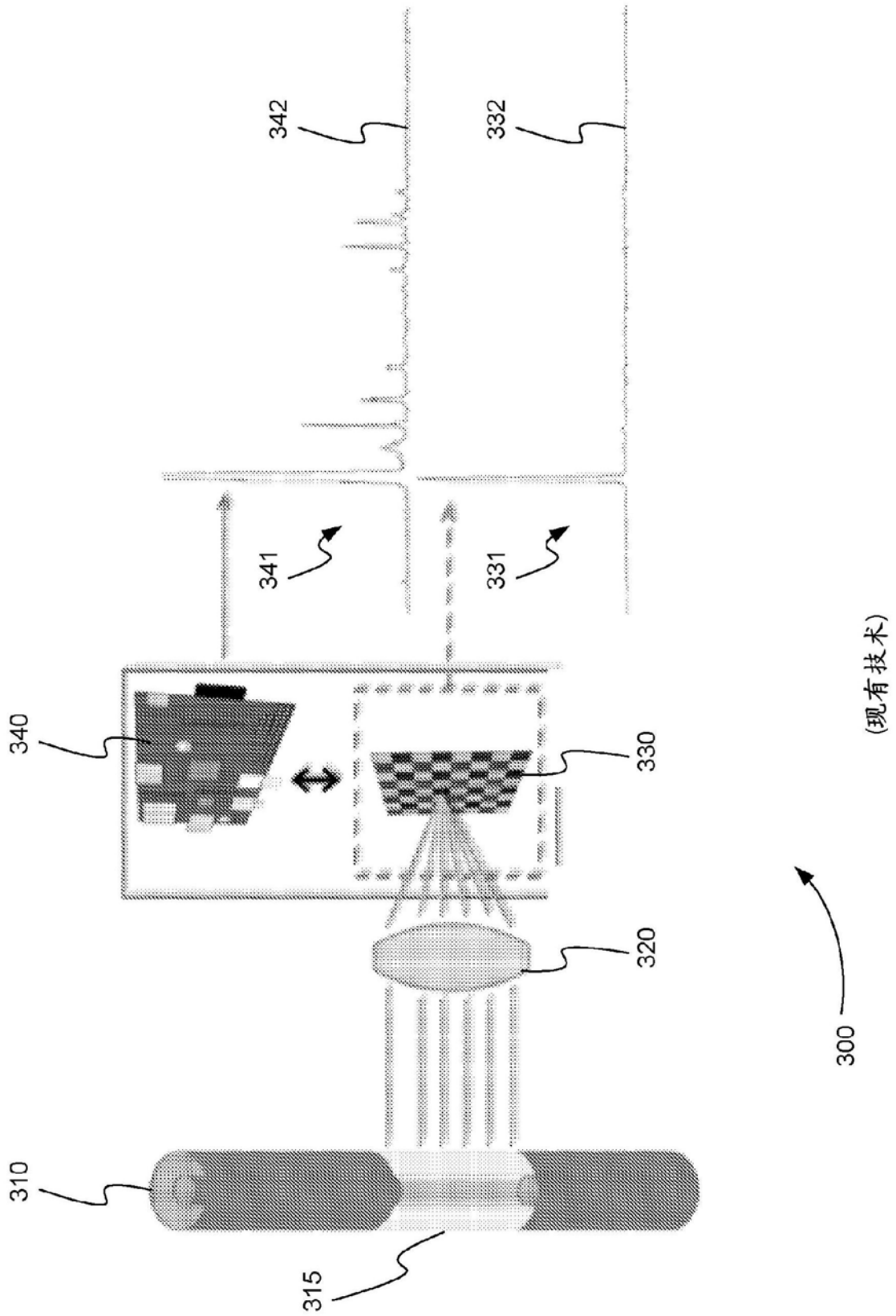


图3

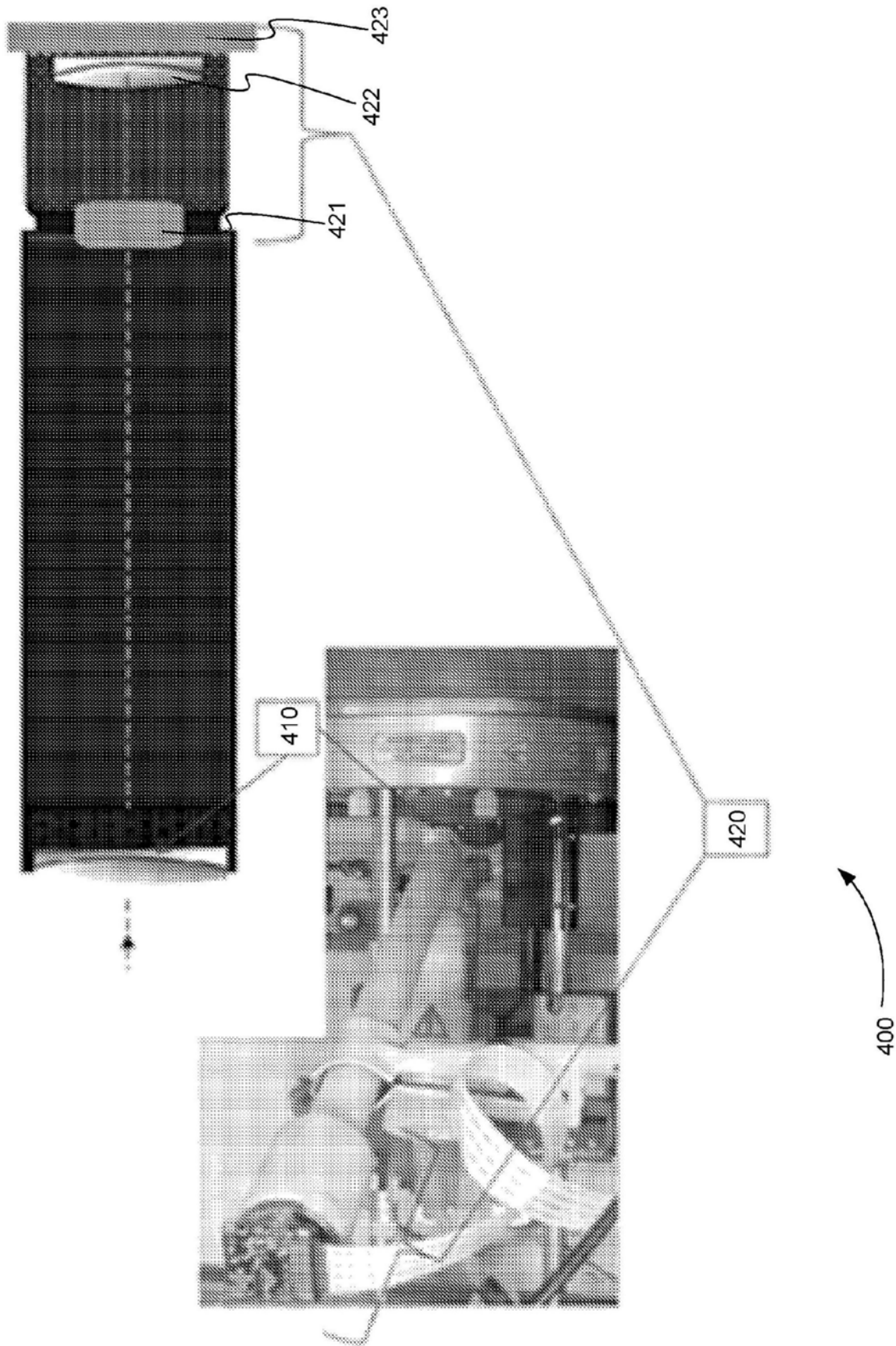


图4

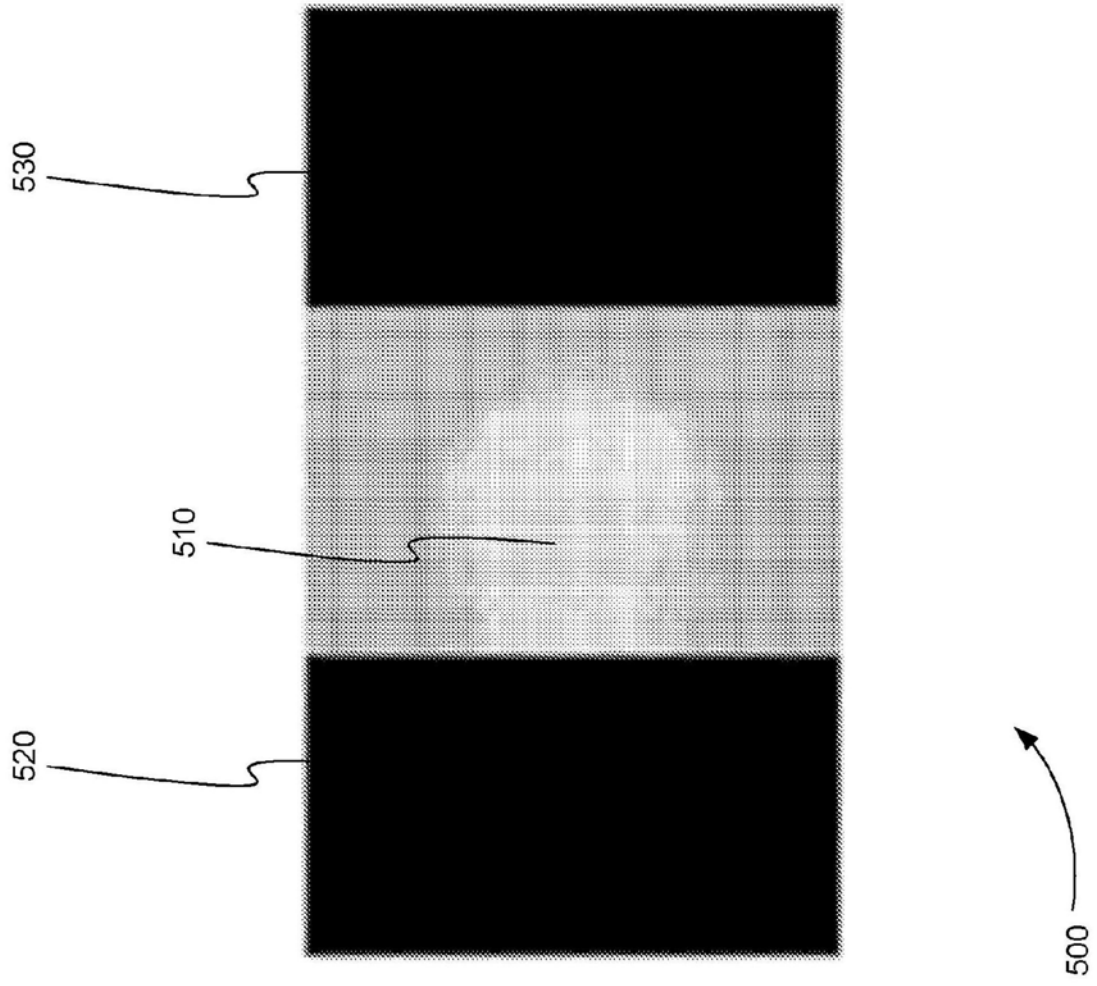


图5

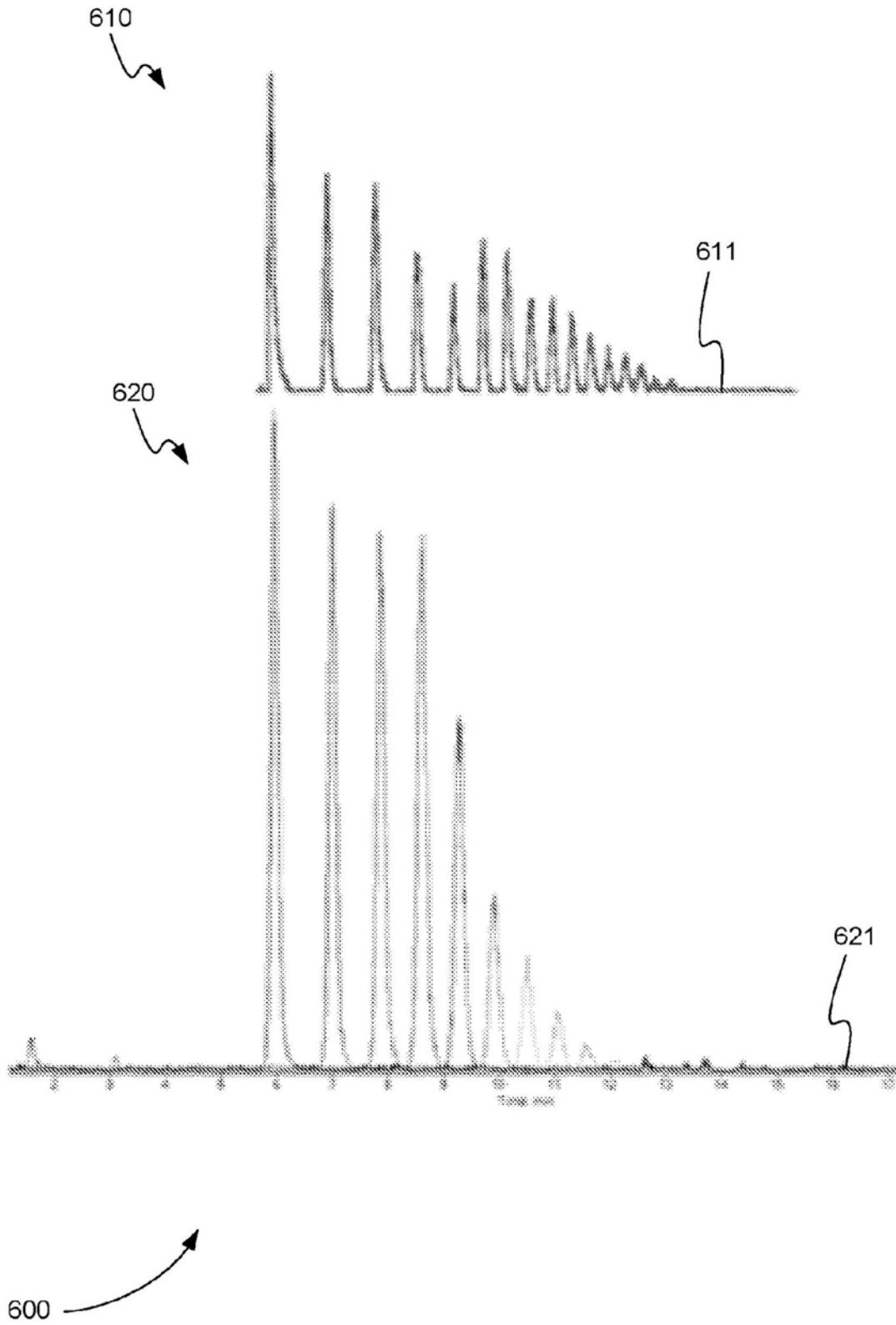
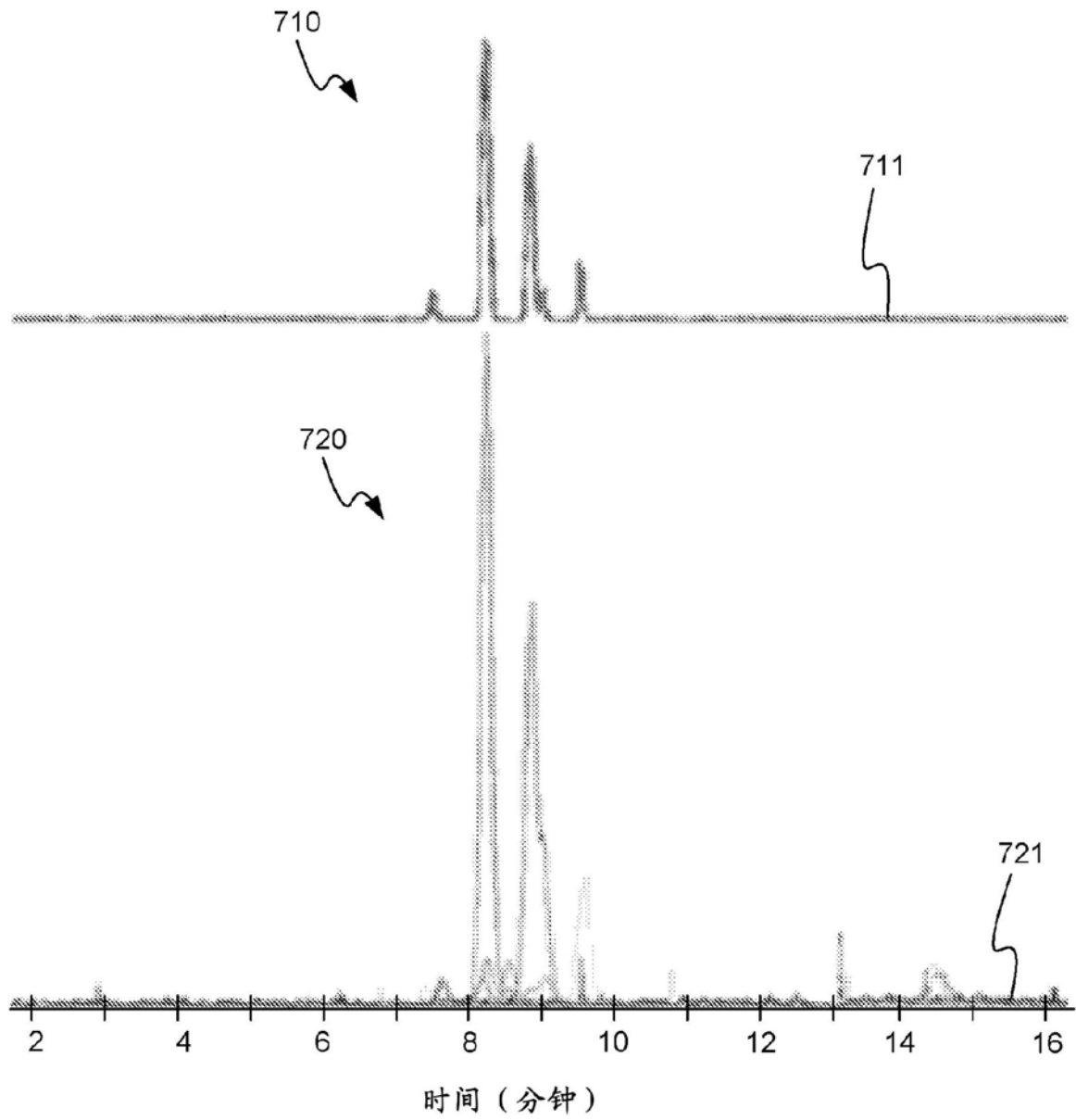


图6



700 →

图7

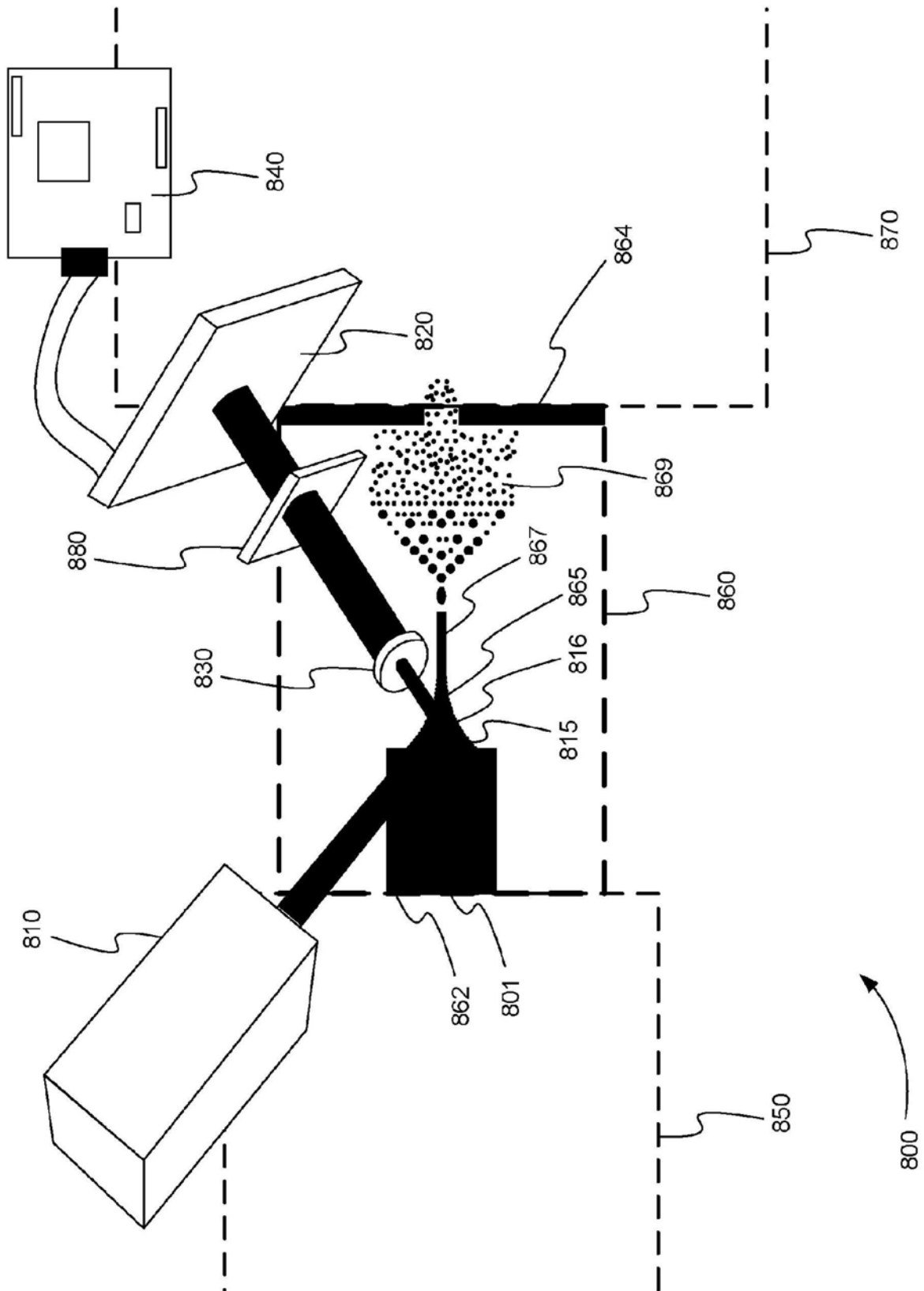


图8

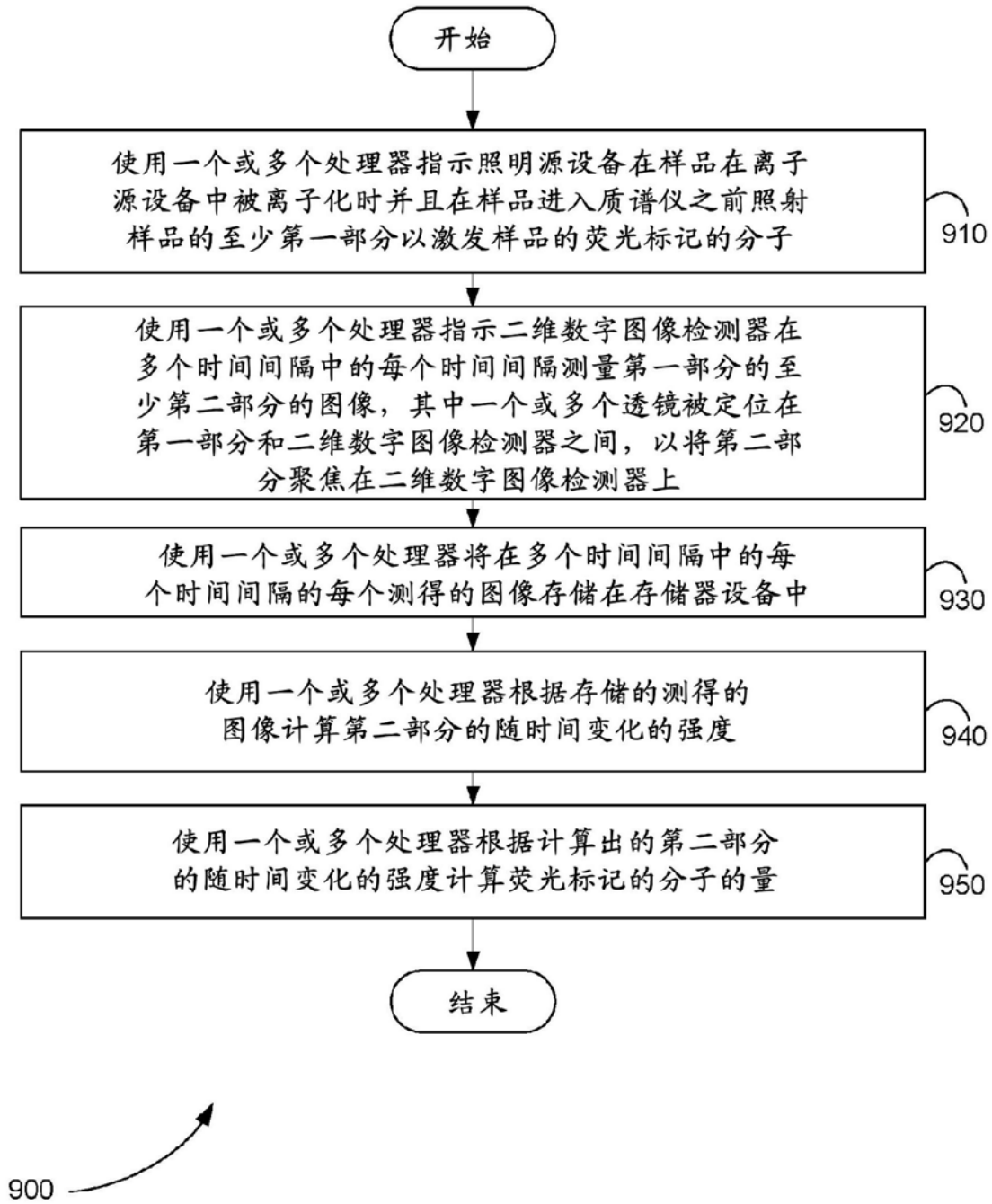


图9

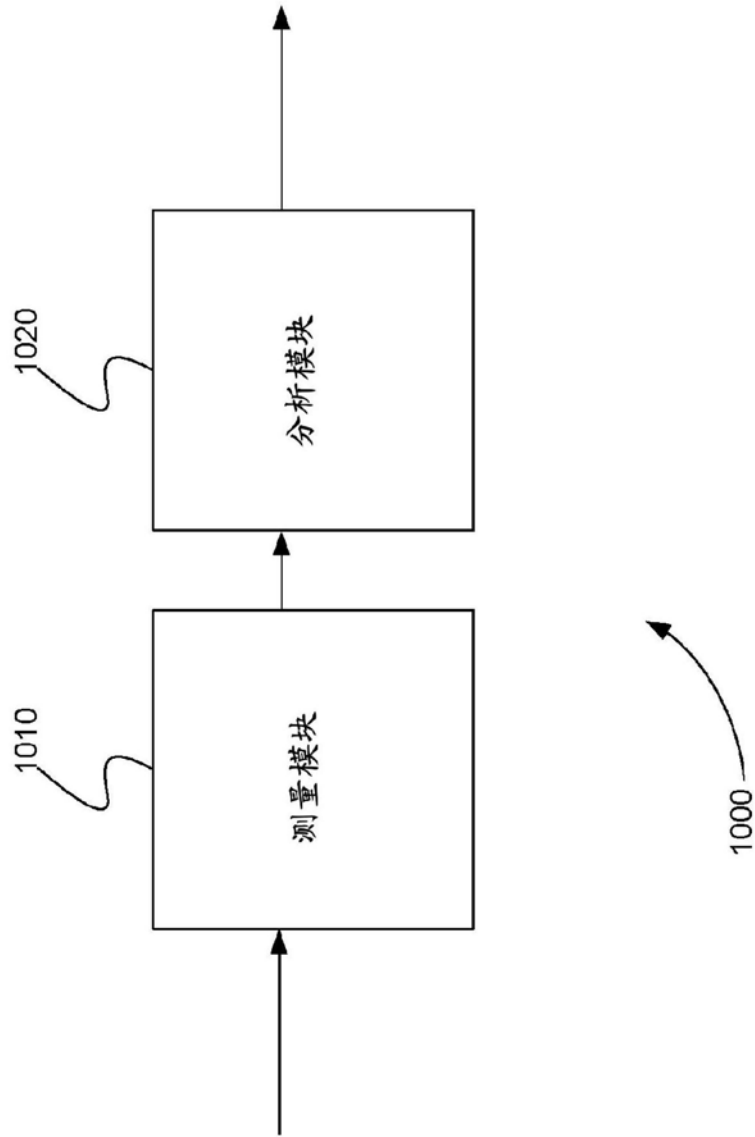


图10